Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. D. Henschler

MUTAGENITÄT VON CIS- UND TRANS-1,3-DICHLORPROPEN IM AMES-TEST

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Anneliese Stefani
aus Kronstadt

Würzburg, den 26. Juni 1980

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. D. Henschler

MUTAGENITÄT VON CIS- UND TRANS-1,3-DICHLORPROPEN IM AMES-TEST

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Anneliese Stefani
aus Kronstadt

Würzburg, den 26. Juni 1980

Referent:	Professor Dr.med. D. Henschler
Korreferent:	Priv.Doz. Dr.med. M. Metzler
Dekan:	Professor Dr.med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1	Salmonella typhimurium-Teststämme	4
2.2	Aufbewahrung der Bakterien	5
2.3	Induktion von Rattenleber-Enzym und Herstellung eines Leberhomogenats	6
2.4	Herstellung der S9-Mischung	7
2.5	Testsubstanzen	7
2.6	Topagar	8
2.7	Minimalagar	8
2.8	Vollagar	8
2.9	Nährbouillon	9
2.10	Mutagenitätstest auf Agarplatten ("Direktmethode")	9
2.11	Mutagenitätstest in Flüssigkultur ("Inkubationsmethode")	10
2.12	Chemikalien	11
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN	12
3.1	Prüfung der Mutagenität von trans-1,3-DCP an den fünf Testerstämmen ohne Mikrosomen	12
3.2	Vergleich der Mutagenität von cis- und trans-1,3-DCP ohne Mikrosomen	14
3.3	Vergleich der Toxizität von cis und trans-1,3-DCP ohne Mikrosomen	16
3.4	Einfluß von Mikrosomen auf die Mutagenität und Toxizität von cis- und trans-1,3-DCP	16
	a) Inkubationsmethode	16
	b) Direktmethode	22
4.	ZUSAMMENFASSUNG	28
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S		I - IV

Digitized by the Internet Archive
in 2026

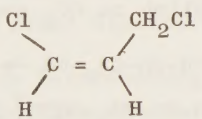
https://archive.org/details/IA41543519_0100

1. EINLEITUNG

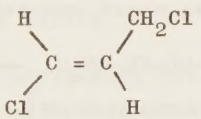
Mehrere chlorierte Kohlenwasserstoffe sind in neuer Zeit als Carcinogene bzw. Mutagene identifiziert worden. So z.B. Trichloräthylen (1), Vinylchlorid (2 - 5), Vinylidenchlorid und 2-Chlorbutadien (6, 7). Dabei wird postuliert, daß diese Verbindungen zunächst durch mikrosomale Aktivierung im Organismus zu elektrophilen Epoxiden umgewandelt werden, die dann ihrerseits als alkylierende Agentien mit dem Erbmaterial in Wechselwirkung treten.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, zu prüfen, ob ein solcher Mechanismus auch im Falle von 1,3-Dichlorpropen (1,3-DCP) wirksam werden kann.

1,3-DCP findet vor allem als Nematozid bei der Bodensterilisation im landwirtschaftlichen Bereich Verwendung. Es ist eine farblose Flüssigkeit von chloroformähnlichem Geruch und tritt in zwei isomeren Formen auf, für die folgende physikalischen Daten gelten:



cis - 1,3 - DCP



trans - 1,3 - DCP

	cis - 1,3 - DCP	trans - 1,3 - DCP
d_4^{20}	1,224	1,217
n_D^{24}	1,4682	1,4730
SP	104,2 C	112,1 C

Die LD_{50} beträgt für Ratten 250 - 500 mg/kg (8), die höchste zulässige Luftkonzentration ist 5 mg/m^3 (8).

Unter dem Namen "Telone" ist in den USA ein technisches Gemisch von 1,3-DCP im Handel (8). Von der Shell Company wird die sogenannte "D-D"-Mischung produziert, die 1,3-DCP als Hauptbestandteil enthält, nämlich 28 % cis-1,3-DCP und 26 % trans-1,3-DCP; auf 1,2-Dichlorpropan entfallen 23 %, der Rest auf Trichlorpropan u.a. (9).

In Form dieser "D-D"-Mischung und ähnlicher Produkte gelangt 1,3-DCP in zum Teil erheblichen Mengen in die Umwelt. Je nach Bodentyp und Anbauweise werden beispielsweise für "D-D" 150 bis maximal 1000 Liter/ha empfohlen (9).

Laboruntersuchungen von Castro und Belser (10) haben gezeigt, daß die beiden Isomeren von 1,3-DCP in gepufferten Lösungen und wäßrigen Erdaufschwemmungen unter Freisetzung von Chloridionen zu den entsprechenden 3-Chlorallylalkoholen hydrolysiert werden. In einer späteren Studie untersuchten die beiden Autoren die Metabolisierung dieser beiden isomeren 3-Chlorallylalkohole durch Pseudomonas spec. (11). Sie konnten zeigen, daß dabei zunächst die entsprechenden 3-Chloracrylsäuren entstehen, die dann dehalogeniert und schließlich zu CO_2 umgesetzt werden:

$$Cl\text{-}CH{=}CH\text{-}CH_2Cl \rightarrow Cl\text{-}CH{=}CH\text{-}CH_2\text{-}OH \rightarrow Cl\text{-}CH{=}CH\text{-}COOH \rightarrow$$
$$\left[HO\text{-}CH{=}CH\text{-}COOH\right] \rightarrow \left[O{=}CH\text{-}CH_2\text{-}COOH\right] \rightarrow CO_2$$

Messungen der Abbaurate von 1,3-DCP durch van Dijk (12) erbrachten zwar verschiedene Werte für verschiedene Bodentypen. Immer aber war sie für die beiden Isomeren sehr ähnlich, und in jedem Fall waren die entsprechenden 3-Chlorallylalkohole wesentlich länger nachweisbar als 1,3-DCP. Untersuchungen mit einer Mischung aus ^{14}C-markiertem 1,3-DCP und 1,2-Dichlorpropan haben gezeigt, daß

im Falle von Kartoffelkulturen 6 Monate nach Bodenbehandlung zwar nur Spuren von Radioaktivität in den Kartoffelknollen nachweisbar waren. Auf der anderen Seite aber zeigten diese Versuche, daß 1,3-DCP als stark flüchtige Verbindung schnell aus dem Boden in die Atmosphäre übertritt und auf diese Weise als Umweltfaktor relevant werden kann (9).

Versuche zur Toxizität von 1,3-DCP wurden u.a. auch von Torkelson und Oyen durchgeführt (13). Ratten und Meerschweinchen wurden mit 50 bzw. 11 ppm 1,3-DCP 7 Stunden täglich, 5 Tage wöchentlich, einen Monat lang beatmet; danach zeigten sich Leber- und Nierenschäden. Bei Langzeitversuchen mit kleineren Konzentrationen - 3 bzw. 1 ppm über 6 Monate - mit 4 Arten von Versuchstieren (Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden) wurden geringfügige, mikroskopische Veränderungen an den Nieren bzw. keine Veränderungen entdeckt. 3 Monate nach Beendigung der Versuche konnten keine Veränderungen mehr festgestellt werden. Diesen Untersuchungen entsprechend wird für Menschen empfohlen, daß bei langdauernder Exposition von 1,3-DCP-Dämpfen von durchschnittlich 8 Stunden täglich die Konzentration 1 ppm nicht überschreiten sollte.

Die vorliegende Untersuchung zur Bestimmung der Mutagenität von 1,3-DCP basiert auf dem vitro-Testsystem mit Salmonella typhimurium nach Ames (14). Mit Hilfe dieser Methode sollten vor allem folgende 3 Fragen beantwortet werden:

1.) Ist 1,3-DCP mutagen?

2.) Bedarf es, um als Mutagen zu wirken, mikrosomaler Aktivierung?

3.) Gibt es Unterschiede in der Mutagenität zwischen den beiden Isomeren von 1,3-DCP?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Salmonella typhimurium-Teststämme

Die für diese Untersuchungen verwendeten Teststämme TA-1535, TA-1537, TA-1538, TA-98 und TA-100 von Salmonella typhimurium wurden freundlicherweise von Dr. H. Glatt vom Institut für Toxikologie der Universität Mainz zur Verfügung gestellt, der sie seinerseits von Bruce Ames, Berkeley, erhalten hatte.

Die Stämme unterscheiden sich durch den Typ ihrer Histidin-Mutation:

Stamm	Histidin Mutation	Zusätzliche Mutation	Rückmutations-mechanismus
TA-1535	his G46	rfa uvrB	Basenpaar-substitution
TA-1537	his C3076	rfa uvrB	frameshift
TA-1538	his D3052	rfa uvrB	frameshift
TA-98	his D3052	rfa uvrB R-Plasmid	frameshift
TA-100	his G46	rfa uvrB R-Plasmid	Basenpaar-substitution

TA-1535 eignet sich zum Nachweis von Mutagenen, die Basenpaarsubstitutionen verursachen. TA-1537 und TA-1538 dienen zur Entdeckung verschiedener Arten von frameshift-Mutagenen. Während TA-1537 am Ort der Mutation eine Folge von

Cytidin-Nucleotiden besitzt (14) und besonders gut auf Carcinogene wie etwa 9-Aminoacridin anspricht, ist TA-1538 durch eine repetitive Folge von Cytidin und Guanidin (...C-G-C-G...) am Ort der Histidinmutation gekennzeichnet und wird durch Carcinogene wie etwa 2-Nitrosofluoren besonders gut revertiert.

Zusätzlich zur Histidinmutation trägt jeder Testerstamm zwei weitere Mutationen, wodurch die Empfindlichkeit für Mutagene beträchtlich gesteigert wird. Eine dieser zusätzlichen Mutationen verursacht den Verlust der Lipopolysaccharid-Hülle als Teil der Bakterienzellwand (rfa). Dadurch wird der Durchtritt von Stoffen durch die Zellwand sehr erleichtert. Die zweite Zusatzmutation sämtlicher Testerstämme bewirkt den Verlust des sogenannten Exzision-repair-Systems (uvrB), was zur Folge hat, daß viele Mutationen nicht mehr repariert und damit erst nachweisbar werden (14).

Die beiden Stämme TA-98 und TA-100 besitzen jeweils einen Resistenz-Transfer-Faktor (R-Plasmid), der sich in Form einer Antibiotikaresistenz auswirkt, und sind ansonsten mit den Stämmen TA-1538 bzw. TA-1535 identisch. TA-98 und TA-100 sind besonders geeignet zum Nachweis bestimmter Carcinogene (z.B. Aflatoxin B_1, Benzpyren, Methylmethansulfonat), auf die die Testerstämme ohne R-Plasmid nicht oder nur schlecht ansprechen (15).

2.2 Aufbewahrung der Bakterien

Zur Aufbewahrung wurden frische Nährbouillon-Kulturen (4 ml) mit je 0,35 ml Dimethylsulfoxyd versetzt und in sterilen Glasröhrchen mit Schraubdeckel durch Eintauchen in ein Aceton/Trockeneis-Bad schnell gefroren. Diese ge-

frorenen Bakterienkulturen wurden bei -60°C aufbewahrt. Zur Herstellung frischer Kulturen wurden mit Hilfe steriler 1 ml-Pipetten von der Oberfläche der gefrorenen Kulturen einige Eiskristalle abgekratzt, in Nährbouillon (5 ml) gegeben und über Nacht (ca 12 Stunden) bei 37°C geschüttelt.

2.3 Induktion von Rattenleber-Enzym und Herstellung eines Leberhomogenats

Zur Induktion von Leberenzym wurde eine Mischung aus polychloriertem Biphenyl (PCB) mit der Bezeichnung Aroclor 1254 verwendet (16 - 17). Männliche Wistar-Ratten von ca 250 g Gewicht erhielten 5 Tage vor dem Schlachten eine Einzelinjektion (intraperitoneal) von Aroclor 1254, verdünnt in Maisöl auf eine Konzentration von 200 mg/ml, in einer Dosierung von 500 mg/kg. Am 5. Tag wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und in Anlehnung an Garner et al. (18) Leberhomogenat wie folgt gewonnen:

Die Rattenleber (zwischen 10 und 15 g pro Tier) wurde den frisch getöteten Tieren entnommen und in einem Becherglas mit ca 10 ml 0,15 M KCl gewaschen. Dann wurde sie gewogen, mit einer sterilen Schere in kleine Stücke geschnitten und zusammen mit dem 3-fachen Volumen KCl (3 ml/g Leber) im Potter-Homogenisator vermengt. Das Homogenat wurde mit 9 000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand nach vorsichtigem Absaugen der obenauf schwimmenden Fettschicht dekantiert. Alle Schritte wurden bei 0 - 4°C durchgeführt, und es wurden sterile Lösungen und Behälter benützt. Der dekantierte Überstand, die sogenannte S9-Fraktion, wurde in 2 ml-Portionen auf Plastikröhrchen mit Druck-

deckelverschluß verteilt, im Aceton/Trockeneis-Gemisch schnell gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -60°C aufbewahrt. Proteinbestimmungen nach Lowry ergaben durchweg etwa 40 mg/ml S9-Fraktion. Somit enthielt 1 ml S9-Fraktion Mikrosomen von 250 mg Leber.

2.4 Herstellung der S9-Mischung

Nach Ames et al. (14) enthält die S9-Mischung folgende Bestandteile in folgenden Konzentrationen (pro 1 ml): $MgCl_2$ (8 mM), KCl (33 mM), NADP (4 mM), Glucose-6-Phosphat (5 mM), Natriumphosphat pH 7,4 (100 mM) und 0,3 ml S9-Fraktion. Stammlösungen dieser Einzelbestandteile wurden in jeweils 10-fach höherer Konzentration hergestellt und im Falle der Salze autoklaviert. Die Stammlösungen von NADP und Glucose-6-Phosphat wurden dagegen über Milliporefilter steril filtriert und bei -20°C gelagert. Zur Herstellung von 10 ml S9-Mischung wurden dann zu 2 ml sterilen Wassers je 1 ml der jeweiligen Stammlösungen und 3 ml frisch aufgetaute S9-Fraktion gegeben. S9-Mischung wurde vor Verwendung immer frisch hergestellt und in Eis gehalten.

2.5 Testsubstanzen

cis- und trans-1,3-DCP wurden als Flüssigkeiten entweder direkt dem Topagar bzw. Inkubationsmedium zugesetzt oder (im Bereich niedriger Testkonzentrationen) mit Dimethylsulfoxyd (DMSO) verdünnt. Ebenso wurde in DMSO 2-Aminoanthracen gelöst, das zum Nachweis bzw. zur Kontrolle der Mikrosomenaktivität diente.

2.6 Topagar

Topagar, bestehend aus 6 g Difco Agar und 6 g NaCl pro 1 l Wasser, wurde in 100 ml-Portionen auf Flaschen verteilt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Vor Verwendung wurde der Agar in kochendem Wasserbad geschmolzen und zum flüssigen Agar unter Rühren pro 100 ml 5 ml 0,5 mM L-Histidin-HCl und 5 ml 0,5 mM Biotin gegeben. Dann wurde der noch heiße Topagar in 2 ml-Portionen auf Plastikröhrchen verteilt und bis zum Ausgießen auf die Agarplatten im Warmbad bei 45°C gehalten.

2.7 Minimalagar

Zur Herstellung von Minimalagar wurden in 1 l heißem Wasser 15 g Difco-Agar und 20 g Glucose gelöst, autoklaviert, und dann je 20 ml der Lösung 1 bzw. 10 ml der Lösung 2 zur Erzielung des Vogel-Bonner-E-Mediums zugesetzt (19). Lösung 1 enthält auf 670 ml H_2O: 655 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 100 g Citronensäure-1 H_2O und 175 g $NaNH_4 PO_4 \cdot 4H_2O$. Lösung 2 bestand aus 20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ gelöst in 1 l H_2O. Beide Lösungen wurden vor Verwendung autoklaviert. Nach Abkühlung auf etwa 50°C wurde der Minimalagar auf Platten gegossen (ca 20 ml pro Platte) und nach Erkalten bis zur Verwendung im Kühlraum bei 4°C gelagert.

2.8 Vollagar

Für Toxizitätsbestimmungen wurden Platten mit sogenanntem Vollagar hergestellt, der sich vom Minimalagar nur dadurch unterscheidet, daß er zusätzlich noch 8 g

Difco-Bacto-Nutrient Broth pro Liter enthält. Durch den Zusatz von Nutrient Broth enthält der Vollagar genügend Histidin, um allen aufgebrachten lebenden Zellen eines His^--Testerstammes die Vermehrung, d.h. Koloniebildung zu gestatten. Vollagar eignet sich demnach für die Bestimmung der Überlebensrate der Bakterien in Abhängigkeit von der Konzentration der zu untersuchenden Substanz. Salmonella typhimurium wächst auf Vollagar sehr schnell. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C sind bereits nach 12 Stunden große Kolonien sichtbar.

2.9 Nährbouillon

In 1 Liter Wasser wurden 8 g Difco-Bacto-Nutrient Broth und 4 g NaCl gelöst und anschließend in Portionen von je 50 ml autoklaviert.

2.10 Mutagenitätstest auf Agarplatten ("Direktmethode")

In je 2 ml Topagar von 45°C wurde jeweils 0,1 ml der über Nacht gewachsenen Bakterienkultur in Nährbouillon gegeben, dazu die zu testende Substanzprobe (bis zu 0,1 ml Volumen) sowie gegebenenfalls 0,5 ml der S9-Mischung. Dann wurde kurz geschüttelt und das Ganze zugleich auf eine Minimalagarplatte geschüttet. Durch vorsichtiges Kippen und Drehen wurde erreicht, daß sich der Topagar gleichmäßig auf der Plattenoberfläche verteilte. Bis zum Erstarren der Topagarschicht wurden die Platten zunächst einige Zeit (mindestens 5 Minuten) bei Raumtemperatur stehengelassen und dann in umgedrehter Lage (Plattenboden mit Agar nach oben weisend) in den Inkubator gegeben.

Nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Bakterienkolonien (verursacht durch histidinauxotrophe Revertanten) gezählt.

Für Toxizitätsbestimmungen wurde in ganz analoger Weise vorgegangen, nur daß in diesem Fall das Gemisch aus Bakterien und DCP mit oder ohne S9-Mischung zunächst 10^6-fach mit 0,9 % NaCl verdünnt wurde, die Platten Vollager enthielten und die Inkubationsdauer auf Grund des rascheren Bakterienwachstums auf Vollager nur 1 Tag betrug.

2.11 Mutagenitätstest in Flüssigkultur ("Inkubationsmethode")

Diese Form des Mutagenitätstests ist dadurch gekennzeichnet, daß der Kontakt zwischen Mutagen und Bakterien nicht erst im Topagar, sondern bereits vorher stattfindet. Das Mutagen - und gegebenenfalls S9-Mischung - wird direkt einer wachsenden Bakterienkultur (in 5 ml Nährbouillon) im Schüttelinkubator bei 37°C zugesetzt. Nach 2 Stunden Inkubation werden die Bakterien abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 3 000 rpm, 5 Minuten), der Überstand verworfen, der Bakterienniederschlag in gleichem Volumen resuspendiert, abermals abzentrifugiert und dann schließlich in 0,5 ml Nährbouillon resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension werden je 0,1 ml zu 2 ml Topagar gegeben und dieser wie üblich ausgegossen, und zwar auf Minimalagarplatten im Falle von Mutagenitätsuntersuchungen, auf Vollagarplatten - und 10^6-fach mit 0,9 % NaCl verdünnt - zur Toxizitätsbestimmung. Die Effizienz dieser Testmethode ist von der in Punkt 10 beschriebenen Standardmethode verschieden, soll aber im allgemeinen schlechter sein. Einige Mutagene, z.B. Dimenthyl- und Diäthylnitrosamin, lassen sich mit diesem Verfahren besser nachweisen (20). Bei den hier geschilderten Untersuchungen mit 1,3-DCP erwies es sich als besser.

2.12 Chemikalien

1,3-DCP wurde freundlicherweise von der Shell Company, Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Die gaschromatographische Reinheitsprüfung, durchgeführt von der Shell Company, Frankfurt, erbrachte folgende Werte: cis-1,3-DCP 99,97 % (Verunreinigungen: 0,01 % 3,3-Dichlorpropen-1, 0,02 % 1,2-Dichlorpropan); trans-1,3-DCP 97,46 % (Verunreinigungen: 1,32 % 3,3-Dichlorpropen-1, 0,37 % cis-1,3-DCP, 0,85 % "Heavy ends").

Zu Kontrollzwecken wurden die Substanzen in unserem Institut noch einmal auf ihren Reinheitsgrad geprüft, wobei die gaschromatographischen Ergebnisse sich mit den Angaben der Shell Company weitgehend decken: cis-1,3-DCP 99 %, trans-1,3-DCP 96 %.

DMSO, NaCl, KCl, $MgCl_2$, $NaNH_4HPO_4$, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, Glucose: Merck, Darmstadt (jeweils p.a.-Qualität).

Glucose-6-Phosphat, Histidin, Biotin: Serva, Heidelberg.

NADP: Boehringer, Mannheim

Wäßrige Lösungen wurden immer in doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

DIFCO-Agar, Nutrient Broth: Otto Nordwald, Hamburg.

Aroclor 1254 wurde freundlicherweise von Dr. Glatt vom Institut für Toxikologie der Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

Plastik-Petrischalen (90 mm x 15 mm), Plastikröhrchen mit Steckverschluß (75 mm x 12 mm): Greiner, Nürtingen.

Glasröhrchen mit Schraubverschluß (105 mm x 12 mm): Sovirel, France.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN

3.1 Prüfung der Mutagenität von trans-1,3-DCP an den fünf Testerstämmen ohne Mikrosomen

Zur Mutagenitätsprüfung einer Substanz im Ames-Test ist es zunächst einmal notwendig festzustellen, welcher der Salmonella typhimurium-Testerstämme überhaupt bzw. welcher besonders gut zum Nachweis einer eventuellen Mutagenität der fraglichen Substanz geeignet ist. Deshalb wurde zunächst einmal die Wirkung von trans-1,3-DCP auf sämtliche zur Verfügung stehende Testerstämme (TA-1535, TA-1537, TA-1538, TA-98, TA-100 - vgl. Material und Methoden) geprüft (Fig. 1).

Das Ergebnis dieser Prüfung ist in zweierlei Hinsicht überraschend:

a) trans-1,3-DCP wirkt mutagen auf TA-1535, TA-1537, TA-1538, und zwar schon ohne mikrosomale Aktivierung.

b) Die Stämme TA-98 und TA-100 sind zum Mutagenitätsnachweis von trans-1,3-DCP offenbar ungeeignet.

Dies zeigt, daß trans-1,3-DCP nicht erst nach mikrosomaler Aktivierung im Sinne einer Epoxidbildung zum Mutagen wird. Entweder findet eine Epoxidierung erst innerhalb der Bakterienzelle durch bakterielle Enzyme statt, oder es liegt ein anderer Mechanismus der mutagenen Wirksamkeit von trans-1,3-DCP vor. Diese Frage wird später nochmals erörtert (s.S. 16).

Unerwartet ist auch der Befund, daß die Mutagenität von trans-1,3-DCP einerseits sowohl bei TA-1535 - Indika-

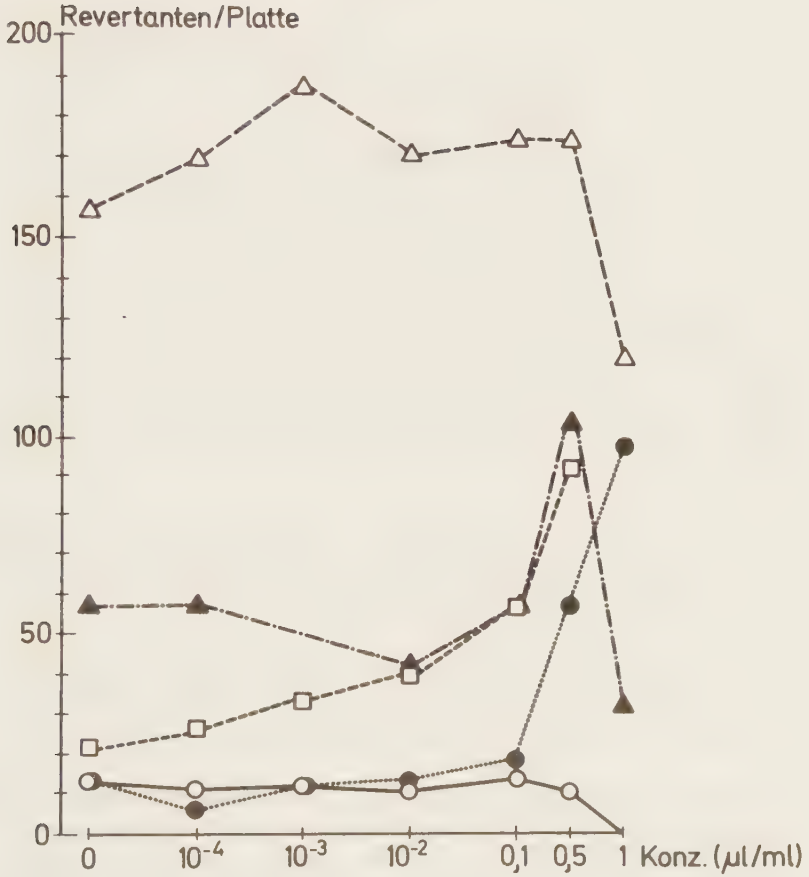


Fig. 1:

Mutagenität von trans-1,3-DCP nach der Inkubationsmethode ohne Mikrosomen an allen 5 Testerstämmen von Salmonella typhimurium: □ TA-1535, ● TA-1537, ▲ TA-1538, o TA-98, △ TA-100.
Die über Nacht in Nährbouillon im Schüttelinkubator bei 37°C gewachsene Bakterienkultur wurde 1 : 10-fach verdünnt, trans-1,3-DCP dazugegeben (zu je 5 ml Bakteriensuspension) und weitere 2 Stunden in der gleichen Vorrichtung inkubiert. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 3000 rpm, 5 Minuten), der Überstand verworfen, der Bakterienniederschlag in gleichem Volumen 0,9 % NaCl suspendiert, abermals abzentrifugiert und schließlich in 0,5 ml 0,9 % NaCl resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden je 0,1 ml zu 2 ml Topagar gegeben und auf Minimalagarplatten ausgegossen. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Bakterienkolonien auf den Platten ausgezählt.

torstamm für missense-Mutationen - als auch bei TA-1537 und TA-1538 - Indikatorstämme für Rasterverschiebungsmutationen - zu beobachten ist, andererseit aber die mit R-Plasmid ausgestatteten Stämme TA-98 und TA-100 keine Empfindlichkeit zeigen. Der Grund für dieses ungewöhnliche Verhalten der Testerstämme bezüglich trans-1,3-DCP wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Kombination verschiedenartiger mutagener Aktivität im Sinne von messense (= TA-1535-spezifischer) - und Rasterverschiebungsmutation (nachweisbar mit TA-1537 bzw. TA-1538) ist allerdings auch schon bei anderen Substanzen, beispielsweise 2-Aminoanthracen, beobachtet worden (6).

3.2 Vergleich der Mutagenität von cis- und trans-1,3-DCP ohne Mikrosomen

Zum Vergleich der mutagenen Potenz beider Isomere wurde nach der Inkubationsmethode die Dosisabhängigkeit der Wirkung von cis-1,3-DCP und trans-1,3-DCP geprüft (Fig. 2).

Dabei zeigte sich, daß cis-1,3-DCP annähernd 3mal stärker mutagen wirkt als trans-1,3-DCP. Die stärkere Mutagenität des Isomers spiegelt sich jedoch nicht nur darin wider, daß es in optimaler Konzentration mehr Revertanten verursacht, sondern daß dieses Wirkungsoptimum für cis-1,3-DCP schon mit 0,1 µl/ml erreicht wird, während es bei trans-1,3-DCP erst bei einer Dosierung von 0,5 µl/ml liegt (vgl. Fig. 3).

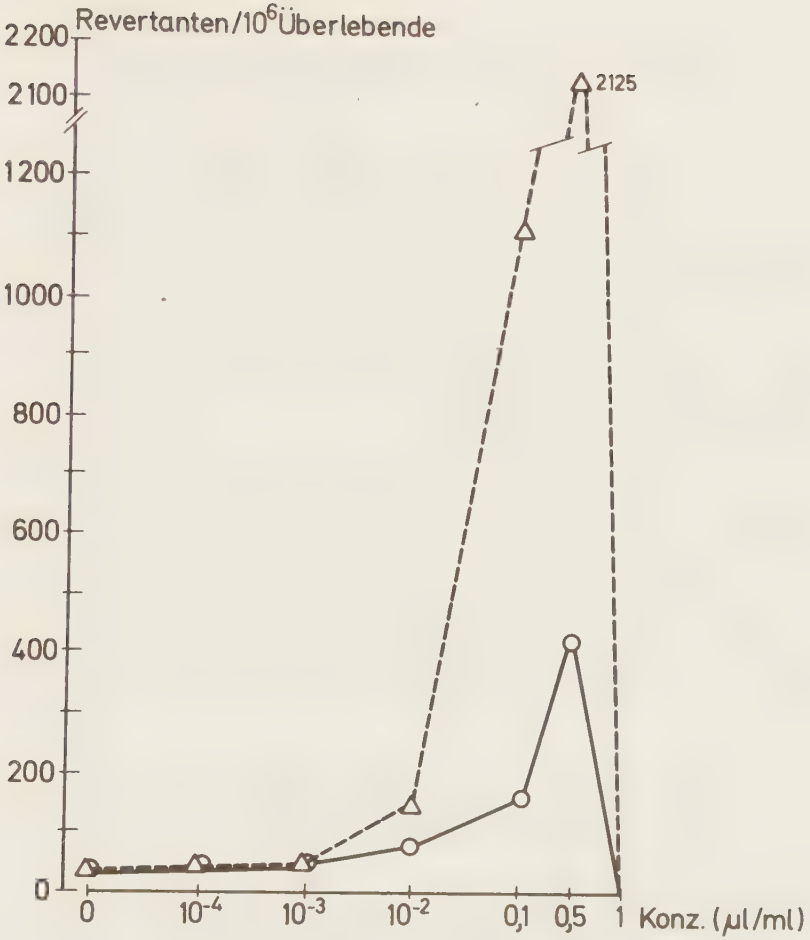


Fig. 2:

Vergleich der Mutagenität von cis-(Δ) und trans-(o) 1,3-DCP nach der Inkubationsmethode ohne Mikrosomen auf Stamm TA-1535.
Testanordnung und -verlauf siehe Legende Fig. 1, mit Ausnahme dessen, daß die über Nacht gewachsenen Bakterien nur 1 : 5-fach verdünnt wurden und je 0,2 ml der mit Testsubstanz inkubierten Bakteriensuspension zu den 2 ml Topagar zugegeben wurden, um dann auf die Minimalagarplatten ausgegossen zu werden.

3.3 Vergleich der Toxizität von cis- und trans-1,3-DCP ohne Mikrosomen

Die Meßbarkeit der mutagenen Wirkung einer Substanz im Ames-Test wird durch deren toxische Wirkung auf die Testbakterien limitiert. Die unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeit des Wirkungsoptimums von cis- und trans-1,3-DCP (vgl. Fig. 2) läßt somit die Vermutung zu, daß hierfür ein Unterschied in der Toxizität beider Isomere im Testsystem verantwortlich ist. Wie ein Vergleich der toxischen Wirkung zeigt, ist dies tatsächlich der Fall (Fig. 3).

Zwar wirken bei einer Dosierung von 1 µl/ml beide Isomere so toxisch, daß sämtliche Bakterienzellen unter den Testbedingungen absterben. Bei einer Konzentration von 0,5 µl/ml hingegen zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Wirkung beider Isomeren. Während im Falle von cis-1,3-DCP bei dieser Dosierung nur 2,2 % überleben, sind es im Falle von trans-1,3-DCP 56,3 %.

3.4 Einfluß von Mikrosomen auf die Mutagenität und Toxizität von cis- und trans-1,3-DCP

a) Inkubationsmethode

Um die Wirkung von Mikrosomen auf die Mutagenität von 1,3-DCP zu prüfen, wurde zunächst cis-1,3-DCP in Gegenwart und Abwesenheit von S9-Mischung (vgl. Material und Methoden) im Ames-Test geprüft (Fig. 4).

Dabei zeigt sich, daß die mutagene Wirkung von cis-1,3-DCP unter dem Einfluß der Mikrosomen stark abnimmt; und zwar in der Optimum-Konzentration von 0,1 µl cis-1,3-DCP/ml um etwa den Faktor 5.

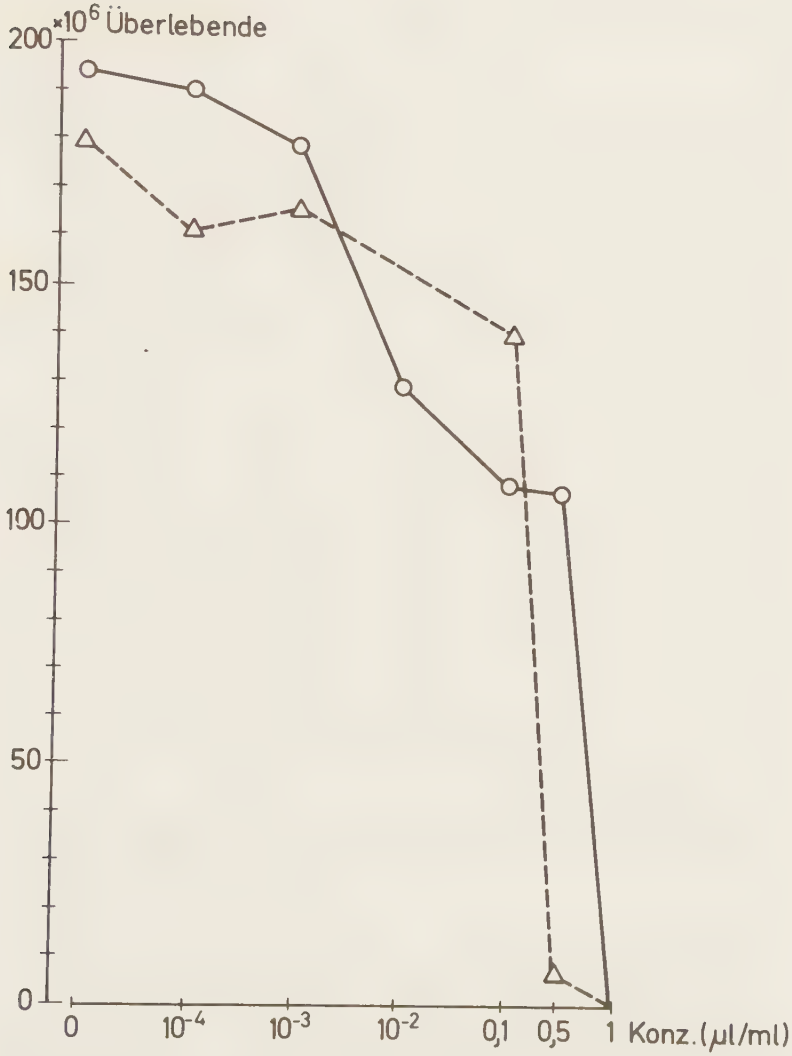


Fig. 3:

Vergleich der Toxizität von cis- und trans-1,3-DCP nach der Inkubationsmethode ohne Mikrosomen auf Stamm TA-1535.

Testanordnung und -verlauf siehe Legende Fig. 2, jedoch wurde die Bakteriensuspension, von welcher je 0,1 ml in 2 ml Topagar gegeben werden, bei allen DCP-Konzentrationen 10^6-fach verdünnt (außer bei der höchsten Konzentration, wo sie nur 10^4-fach verdünnt wurde). Der Topagar wurde auf Vollagarplatten ausgegossen und die Bakterienkolonien wurden bereits nach 1 Tag Inkubation ausgezählt. Δ cis-, o trans-1,3-DCP

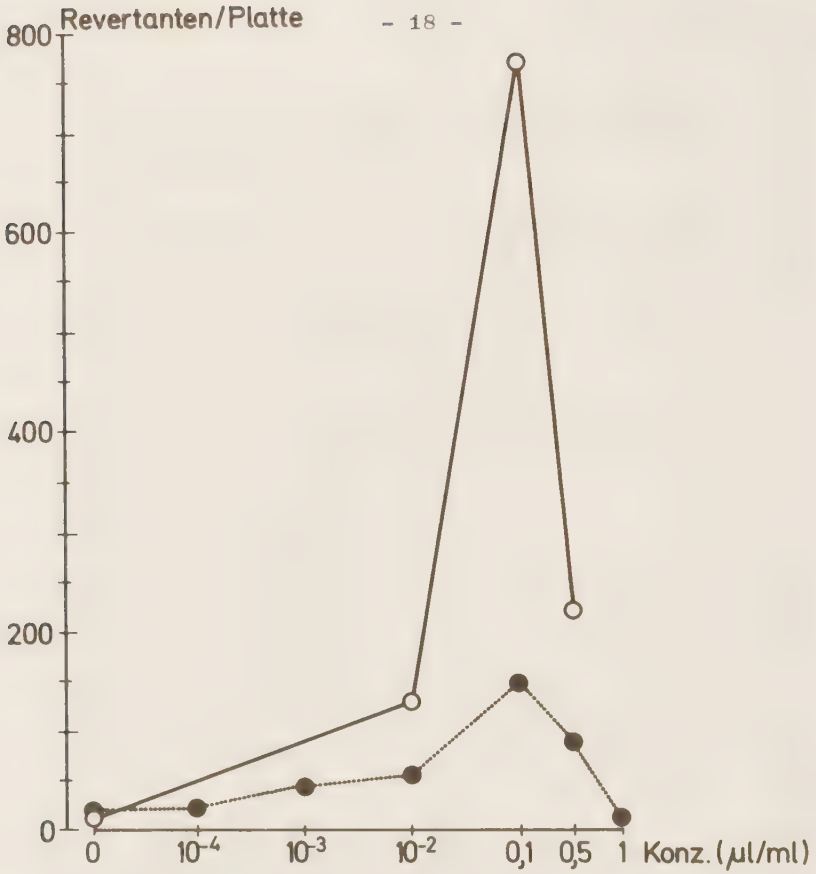


Fig. 4:

Vergleich der Mutagenität von cis-1,3-DCP nach der Inkubationsmethode in Gegenwart (•) und Abwesenheit (o) von S9-Mischung auf Stamm TA-1535.
Die über Nacht in Nährbouillon im Schüttelinkubator bei 37°C gewachsene Bakterienkultur wurde 1 : 5-fach verdünnt, cis-DCP in verschiedenen Konzentrationen und zum Teil keine, zum Teil je 1 ml S9-Mischung dazugegeben (zu je 4 ml Bakteriensuspension, das entspricht 0,2 ml S9-Mischung/ml Bakterien). Nach 2 Stunden weiterer Inkubation im Schüttelinkubator bei 37°C wurden die Bakterien abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 4000 rpm, 5 Minuten), der Überstand verworfen, der Bakterienniederschlag in gleichem Volumen 0,9 % NaCl suspendiert, abermals abzentrifugiert und in 0,5 ml 0,9 % NaCl resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden je 0,2 ml zu 2 ml Topagar gegeben und auf Minimalagarplatten ausgegossen. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Bakterienkolonien auf den Platten ausgezählt (Herstellung der S9-Mischung siehe Legende Tab. 1).

Eine ähnliche, wenn auch nicht ganz so drastische Verminderung der Mutagenität durch Zusatz von S9-Mischung wurde auch im Falle von trans-1,3-DCP beobachtet. Im Bereich des Wirkungsoptimums (0,5 µl trans-1,3-DCP/ml) war in Anwesenheit von 0,2 ml Mikrosomen nur etwa die Hälfte der Mutationsrate ohne S9-Mischung zu erreichen. Wurde die Menge der eingesetzten Mikrosomen erhöht (auf 0,6 ml Mikros/ml), so ergab sich daraus keine signifikante Veränderung dieses Befundes (Fig. 5).

Dies spricht deutlich gegen die Hypothese, daß 1,3-DCP, ähnlich wie dies beispielsweise für die mikrosomale Aktivierung von anderen halogenierten Aliphaten und von einer Reihe polyzyklischer Mutagene/Carcinogene postuliert wurde, erst nach Epoxydierung mutagen wirkt. Denn dann wäre eigentlich eine Steigerung der Mutagenität von 1,3-DCP unter dem Einfluß von S9-Mischung zu erwarten. Da aber im Gegenteil eine starke Beeinträchtigung der Mutagenität in Anwesenheit von Mikrosomen zu beobachten ist, liegt die Vermutung nahe, daß ein anderer Mechanismus, beispielsweise ein radikalischer Reaktionsmechanismus des 1,3-DCP für dessen mutagene Wirkung verantwortlich ist, und mikrosomale Umsetzungsreaktionen, etwa im Sinne einer möglichen Epoxidierung, nur zu einer Beeinträchtigung dieser Wirkung führen.

Unter diesem Aspekt ließe sich dann auch erklären, warum in Anwesenheit gleicher Mikrosomenkonzentrationen (0,2 ml S9-Mischung/ml) die Mutagenität von cis-1,3-DCP um den Faktor 5, die von trans-1,3-DCP aber nur etwa um den Faktor 2 absinkt. Dieser Befund ließe sich so interpretieren, daß das cis-Isomere schneller und besser oxidiert wird als das trans-Isomere und deshalb die mutagen wirksame Konzentration an unveränderten Molekülen im Falle von cis-1,3-DCP rascher absinkt als beim trans-Isomeren.

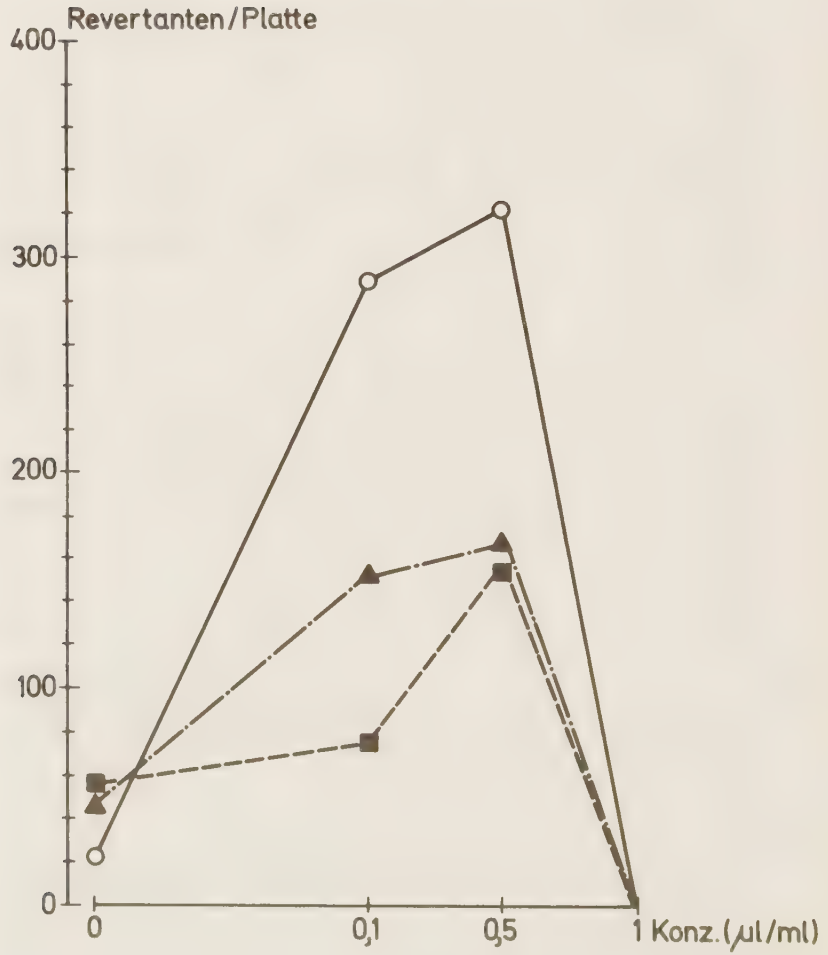


Fig. 5:

Vergleich der Mutagenität von trans-1,3-DCP nach der Inkubationsmethode in Abwesenheit und Gegenwart verschiedener Mengen von S9-Mischung auf Stamm TA-1535.
Testanordnung und -verlauf siehe Legende Fig. 4.
o ohne S9-Mischung, ▲ +0,2 ml S9-Mischung/ml Bakteriensuspension, ■ +0,6 ml S9-Mischung/ml Bakteriensuspension.

Gegen diese Interpretation spricht allerdings der Befund, daß unter den gewählten Testbedingungen der Zusatz von Mikrosomen keine Verschiebung der Optimalkonzentration in Richtung höherer Dosierung bewirkt (vgl. Fig. 4 und Fig. 5). Gerade dies sollte man aber erwarten. Denn wenn bei einer vorgegebenen Optimalkonzentration die Konzentration des "freien", mutagen wirksamen DCP's durch unspezifische Bindung an Protein auf suboptimale Konzentrationen absinkt, dann müßte bei einer entsprechend höheren Ausgangskonzentration der Fall eintreten, daß die verbleibende Konzentration ungebundenen DCP's wieder im Optimalbereich liegt. Eine solche Tendenz ist jedoch, wie ein Vergleich der Kurven in Fig. 4 und Fig. 5 zeigt, unter den dort angewendeten Bedingungen nicht gegeben.

Somit spricht mehr dafür, daß der Verlust an mutagener Wirkung unter dem Einfluß von Mikrosomen wohl darauf beruht, daß es im Laufe der mikrosomalen Umsetzungsreaktionen tatsächlich zu einer dem Mutagenitätsverlust entsprechenden Konzentrationsverminderung des mutagen wirkenden cis- bzw. trans-1,3-DCP kommt.

Betrachtet man unter diesem Aspekt die Wirkung von Mikrosomen auf die Toxizität von trans-1,3-DCP, so lassen die Befunde den Schluß zu, daß das postulierte 1,3-DCP-Epoxid oder eines der Folgeprodukte wesentlich toxischer für die Bakterienzellen ist als 1,3-DCP selbst (Fig. 6).

Wie der Vergleich der Überlebensraten bei einer Konzentration von 0,1 µl trans-1,3-DCP/ml ohne und mit Mikrosomen zeigt, sind nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C in Gegenwart von Mikrosomen in jedem Fall weniger als 50 % der Zellen noch am Leben; ohne Mikrosomen hingegen ist die Überlebensrate bei dieser DCP-Konzentration noch praktisch 100 %.

b) Direktmethode

Gänzlich anders sind die Verhältnisse, wenn die Mutagenität von 1,3-DCP mit Hilfe der Direktmethode (vgl. Material und Methoden) geprüft wird (Tabelle 1).

Im Gegensatz zu den Befunden bei Anwendung der Inkubationsmethode zeigt sich hier, daß

a. die Toxizität von 1,3-DCP in Gegenwart von Mikrosomen nicht zunimmt, sondern im Gegenteil sogar verringert ist, wie ein Vergleich der Tabellenwerte ergibt; zudem zeigt sich,
b. daß Zusatz von Mikrosomen zwar ebenfalls zu einer Verminderung der Mutagenität sowohl von cis- als auch von trans-1,3-DCP in deren jeweiliger Optimalkonzentration führt (0,5 µl/ml bei cis-, 1 µl/ml bei trans-1,3-DCP), daß es aber, wie sich vor allem bei den Werten für cis-1,3-DCP zeigt, bei Anwendung der Direktmethode nach Mikrosomenzusatz nicht nur zu einer Verminderung der Mutagenität, sondern darüber hinaus zu einer Verschiebung des Wirkprofils in Richtung höherer Konzentrationen kommt (vgl. Fig. 7 und Fig. 5).

Zur Erklärung dieser Diskrepanz in den Ergebnissen zweier verschiedener Versuchstechniken könnte folgende Annahme dienen: im Falle der Inkubationsmethode kann das oder können die unter dem Einfluß von Mikrosomen entstehende(n) toxische(n) Umwandlungsprodukt bzw. -produkte während der gesamten Inkubationszeit schädigend im Sinne einer erhöhten Letalität auf die Bakterienzellen wirken. Im Falle der Direktmethode hingegen, wo die chemischen Umsetzungen erst in der Topagar-Schicht ablaufen, ist es vorstellbar - dafür sprechen jedenfalls die mit dieser Methode gewonnenen Befunde -, daß die mikrosomalen Reaktionsprodukte des 1,3-DCP nicht oder nur in sehr geringem

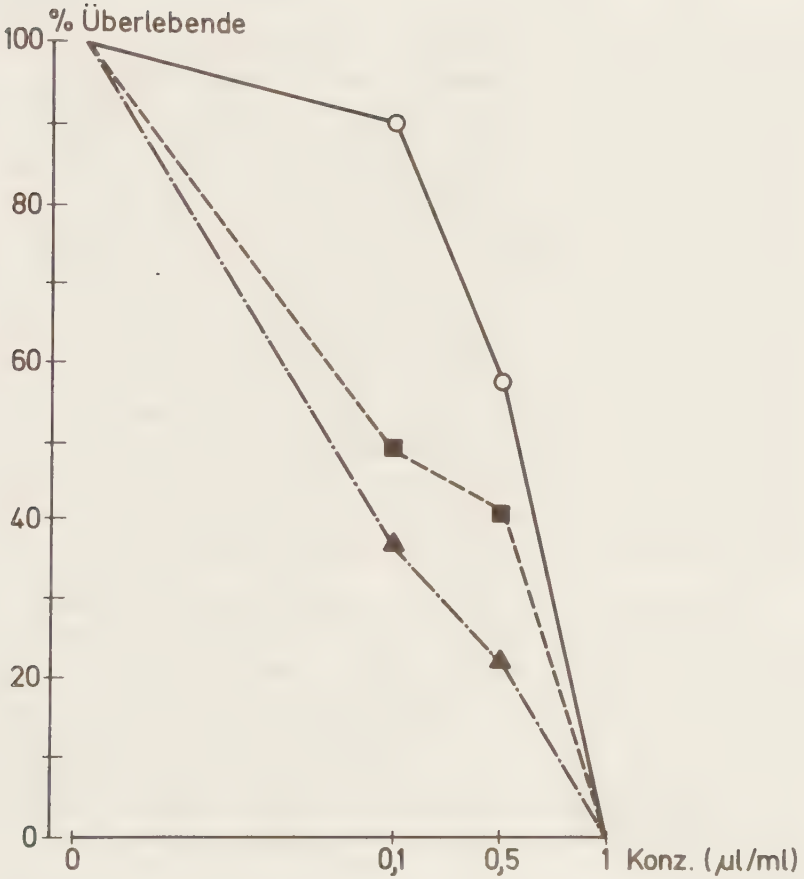


Fig. 6:

Vergleich der Toxizität von trans-1,3-DCP nach der Inkubationsmethode in Abwesenheit und Gegenwart von verschiedenen Mengen Mikrosomen auf Stamm TA-1535.
Testanordnung und -verlauf siehe Fig. 4. Topagar mit Bakterien, Testsubstanz und mit bzw. ohne S9-Mischung wurde 10^{6}-fach verdünnt (bei höchster DCP-Konzentration nur 10^{4}-fach) und auf Vollagarplatten gegossen, die schon nach 1 Tag ausgezählt wurden. ■ +0,6 ml S9-Mischung/ml Bakteriensuspension, ▲ +0,2 ml S9-Mischung/ml Bakteriensuspension, o -S9-Mischung.

Umfang mit den Bakterienzellen in Berührung kommen, weil sie unmittelbar nach ihrer Entstehung am Agar-Agar gebunden werden. Auf diese Weise ihrer Wirksamkeit beraubt, ließe sich einerseits verstehen, warum im Falle der Direktmethode eine Verringerung der Toxizität des 1,3-DCP für die Testbakterien zu beobachten ist (vgl. Tabelle 1): Bei gleicher Ausgangskonzentration an 1,3-DCP wäre nämlich in Gegenwart von Mikrosomen die verbleibende Endkonzentration an 1,3-DCP entsprechend dem Grad der mikrosomalen Umsetzung verringert. Andererseits wäre nach dieser Hypothese auch plausibel, warum es unter diesen Testbedingungen in Anwesenheit von Mikrosomen weniger oder nicht nur zu einer absoluten Verminderung der mutagenen Wirkung von 1,3-DCP kommt, sondern vielmehr vor allem zu einer Verschiebung des mutagenen Wirkungsoptimums in Richtung höherer Ausgangskonzentrationen (vgl. Fig. 7).

Unabhängig von der Frage, ob solche Thesen experimentell bestätigt werden können oder nicht, bleibt festzustellen, daß beide in dieser Untersuchung angewandten Testmethoden den eindeutigen Nachweis einer mutagenen und damit auch potentiell carcinogenen (20) Potenz des Nematozids 1,3-DCP erbrachten, da inzwischen ein kausaler Zusammenhang, zumindest qualitativer Natur, zwischen Mutagenese und Carcinogenese vielfach angegeben wurde (22, 23).

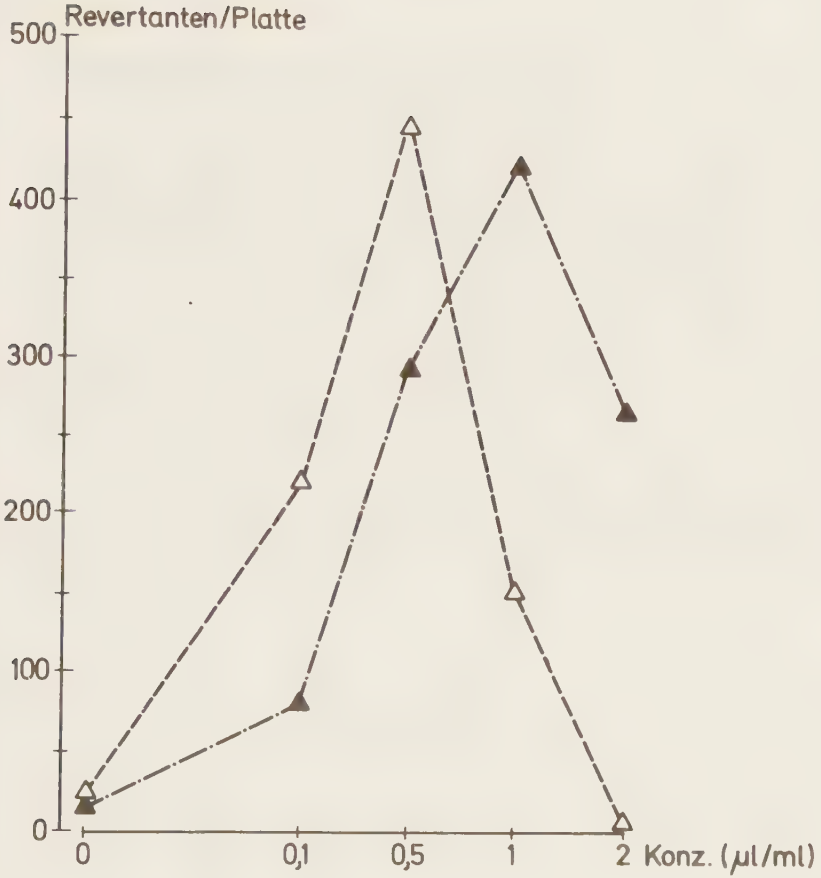


Fig. 7:

Vergleich der Mutagenität von cis-1,3-DCP nach der Direktmethode in Abwesenheit (•) und Gegenwart (▲) von S9-Mischung.

Zu je 2 ml Topagar wurde jeweils 0,1 ml der über Nacht gewachsenen, unverdünnten Bakterienkultur gegeben, dazu cis-1,3-DCP in verschiedenen Konzentrationen und zum Teil keine, zum Teil je 0,5 ml S9-Mischung. Diese Gemische wurden direkt auf Minimalagarplatten ausgegossen. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt.

Tabelle 1: Mutagenität von cis- und trans-1,3-DCP nach der Direktmethode in Gegenwart und Abwesenheit von S9-Mischung

Mutagen Konz. (µ DCP/ml Topagar)	Überlebende ($x 10^8$) Mittelwert von 3 Platten	% Überlebende	Revertanten/ Platte (Mittelwert von 3 Platten ± S.E.)
cis-1,3-DCP ohne S9-Mischung			
-	0,96	100	15 ± 2,64
0,1	0,70	72,9	215 ± 10,59
0,5	0,38	39,6	456 ± 15,55
1,0	0,04	4,2	146 ± 29,68
cis-1,3-DCP mit S9-Mischung			
-	0,81	100	11 ± 1,73
0,1	0,81	100	72 ± 3,71
0,5	0,62	76,5	287 ± 2,02
1,0	0,29	35,8	434 ± 21,2
trans-1,3-DCP ohne S9-Mischung			
-	0,96	100	15 ± 2,64
0,1	0,92	95,8	110 ± 8,14
0,5	0,64	66,7	288 ± 8,02
1,0	0,22	22,9	359 ± 7,12
trans-1,3-DCP mit S9-Mischung			
-	0,81	100	11 ± 1,73
0,1	0,87	107,4	32 ± 4,58
0,5	0,78	96,3	110 ± 6,11
1,0	0,49	60,5	217 ± 2,08

Legende zu Tab. 1:

100 µl über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C gewachsene Bakteriensuspension wurden zusammen mit Testsubstanz in den in der Tabelle aufgeführten Konzentrationen und mit bzw. ohne S9-Mischung (je 0,5 ml S9-Mischung/2 ml Topagar) direkt zum Topagar gegeben. Die S9-Mischung enthielt: 8 mM $MgCl_2$, 33 mM KCl, 5 mM Glucose-6-phosphat, 4 mM NADP, 100 mM Natriumphosphat und 0,3 ml Leberhomogenat (S9-Fraktion)/ml von männlichen Wistar-Ratten, welche durch eine i.p. Einzelinjektion von Aroclor 1254, verdünnt in Maisöl (200 mg/ml), induziert wurden. Die Dosis betrug 500 mg/kg Körpergewicht und wurde den Tieren 5 Tage vor ihrer Tötung verabreicht. Der Topagar mit Bakterien, DCP und S9-Mischung wurde auf Minimalagarplatten ausgegossen und nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt.

Zur Bestimmung der überlebenden Bakterienkolonien (Toxizität) wurde dieses Gemisch aus Bakterien, DCP und S9-Mischung zunächst 10^6-fach mit 0,9 % NaCl verdünnt, dann in den Topagar gegeben und auf Vollagarplatten ausgegossen. Nach 1 Tag Inkubation bei 37°C konnten die Kolonien ausgezählt werden.

4. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde 1,3-DCP auf seine Mutagenität im Ames-Test geprüft, und zwar sollten vor allem folgende drei Fragen beantwortet werden:

1) Ist 1,3-DCP mutagen?

2) Bedarf es, um als Mutagen zu wirken, mikrosomaler Aktivierung?

3) Gibt es Unterschiede in der Mutagenität zwischen den beiden Isomeren von 1,3-DCP?

Für die Untersuchungen wurden folgende Salmonella typhimurium-Stämme verwendet: TA-1535, TA-1537, TA-1538, TA-98 und TA-100.

Der Mutagenitätstest wurde nach zwei Methoden durchgeführt:

a) Direktmethode, bei welcher die Bakteriensuspension, die Testsubstanz und gegebenenfalls Leberhomogenat zugleich auf Agarplatten gegeben und nach 48 Stunden Inkubation die Bakterienkolonien ausgezählt wurden.

b) Inkubationsmethode, die sich von der vorigen dadurch unterscheidet, daß der Kontakt zwischen Mutagen, Bakterien und gegebenenfalls Leberhomogenat nicht erst im Agar, sondern bereits vorher, und zwar für 2 Stunden in einem Schüttelinkubator, stattfindet. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert, der Bakterienniederschlag resuspendiert, die Bakteriensuspension auf Agarplatten ausgegossen und nach 48 Stunden Inkubation ausgezählt.

Die Untersuchungsergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1) Die Mutagenitätsprüfung von cis- und trans-1,3-DCP ohne Mikrosomen ergibt, daß beide Isomere auf die Stämme TA-1535, TA-1537 und TA-1538 mutagen wirken. Cis-1,3-DCP erwies sich als stärkeres Mutagen als das trans-Isomer, da einerseits bei optimaler Konzentration 3 mal mehr Revertanten hervorgerufen wurden und andererseits das Wirkungsoptimum bei einer niedrigeren Dosierung liegt (0,1 µl/ml für cis-1,3-DCP und 0,5 µl/ml für das trans-Isomer).

   Aus diesen Versuchen geht hervor, daß 1,3-DCP ohne mikrosomale Aktivierung mutagen wirkt und die Mutagenität beim cis-Isomer stärker ausgeprägt ist als beim trans-Isomer.

2) Die Mutagenitätsprüfung mit Mikrosomen ergibt nach den zwei unterschiedlichen Methoden folgendes:

   - nach der Inkubationsmethode erwiesen sich beide Isomere als weniger mutagen nach Mikrosomenzusatz. Dabei ist cis-1,3-DCP in der Optimum-Konzentration von 0,1 µl/ml um etwa den Faktor fünf, trans-1,3-DCP in der Optimum-Konzentration von 0,5 µl/ml nur um den Faktor zwei weniger wirksam. Dies führt zur Vermutung, daß 1,3-DCP nicht erst nach Epoxydierung mutagen wirkt, sondern beispielsweise ein radikalischer Reaktionsmechanismus für seine Mutagenität verantwortlich ist.
   - Auch nach der Direktmethode erwiesen sich beide Isomere als weniger mutagen mit Mikrosomenzusatz als ohne. Darüber hinaus zeigte sich eine Verschiebung des Wirkungsprofils in Richtung höherer Konzentrationen.

Herrn Professor Dr. D. Henschler, der mir das Thema überließ und die Möglichkeit zur Arbeit an seinem Institut gab, bin ich dafür, sowie für die Durchsicht meiner Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. Neudecker, der mir außerordentlich bei der Überwindung aller praktischen und theoretischen Schwierigkeiten half.

Den Herren Doktoren E. Dallmeier, E. Eder und R. Hoos danke ich für ihre Unterstützung bei der Lösung besonderer Probleme.

Nicht zuletzt möchte ich noch die stetige, freundliche Hilfe hervorheben, die mir Frau J. Ahamer bei der Durchführung der Versuche und Frau M. Dertinger in vielerlei Belangen leisteten.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Memorandum, Dept. of Health, Education & Welfare, Washington, 20.3.1975

2. Keplinger, M.L., Goode, J.W., Gordon, D.E. and Calandra, J.C.: Interim results of exposure of rats, hamsters, and mice to vinyl chloride. Ann. N.Y. Acad. Sci. 246, 219 (1975)

3. Maltonie, C. and Lefemine, G.: Carcinogenicity bioassays of vinyl chloride. Research plan and early results. Environm. Res. 7, 387 (1974)

4. Greim, H., Bonse, G., Radwan, Z., Reichert, D. and Henschler, D.: Mutagenicity in vitro and potential carcinogenicity of chlorinated ethylenes as a function of metabolic oxirane formation. Biochem. Pharmacology 24, 2013 (1975)

5. Henschler, D. and Bonse, G.: Metabolic activation of chlorinated ethylenes: dependence of mutagenic effect or electrophilic reactivity of the metabolically formed epoxides. Arch. Toxicology 39, 7 (1977)

6. Bartsch, H., Malaveille, C. and Montesano, R.: Human, rat and mouse liver mediated mutagenicity of vinyl chloride in Salmonella typhimurium strains. Int. J. Cancer 15, 429 (1975)

7. Bartsch, H., Malaveille, C., Montesano, R. and Tomatis, L.: Tissue mediated mutagenicity of vinylidene chloride and 2-chlorbutadiene in Salmonella typhimurium.
Nature 255, 641 (1975)

8. Melnikov, N.N.: Chemistry of Pesticides, New York 1971

9. Roberts, T.R. and Stoydin, G.: The degradation of (Z)- and (E)-1,3-dichloropropenes and 1,2-dichloropropane in soil.
Pestic. Sci. 7, 325 (1976)

10. Castro, C.E. and Belser, N.O.: Soil fumigant hydrolysis - hydrolysis of cis- and trans-1,3-dichloropropene in wet soil.
J. Agric. Fd. Chem. 14, 69 (1966)

11. Belser, N.O. and Castro, C.E.: Biodehalogenation - The metabolism of the nematocides cis- and trans-3 chloroallylalcohol by a bacterium isolated from soil.
J. Agric. Fd. Chem. 19, 23 (1971)

12. van Dijk, H.: Degradation of 1,3-Dichloropropenes in the soil.
Agro-Ecosystem 1, 193 (1974)

13. Torkelson, T.R. and Oyen, F.: The toxicity of 1,3-dichloropropene as determined by repeated exposure of laboratory animals.
Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 38, 217 (1977)

14. Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D.: Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2281 (1973)

15. Mc Cann, J., Spingarn, N.E., Kabori, J. and Ames, B.N.: Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 979 (1975)

16. Alvares, A.P., Bickers, D.R. and Kapps, A.: Polychlorinated biphenyls: a new type of inducer of cytochrome P-448 in the liver.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1321 (1973)

17. Schmoldt, A., Benthe, H.F. and Frühling, R.: Induction of rat liver enzymes by polychlorinated biphenyls (PCBs) in dependence of the dose and chlorine content.
Arch. Toxicilogy 32, 69 (1974)

18. Garner, R.C., Miller, E.C. and Miller, J.A.: Liver microsomal metabolism of aflatoxin B_1 to a reactive derivative toxic to Salmonella typhimurium TA 1530.
Cancer Res. 32, 2058 (1972)

19. Vogel, H.J., Bonner, D.M.: Acetylornithinase of Escherichia coli: partial purification and some properties.
J. Bio.Chem. 218, 97 (1956)

20. Ames, B.N., Kammen, H.O. and Yamasaki, E.: Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2423 (1975)

21. Mc Cann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N.: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella microsome test: assay of 300 chemicals.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 5135 (1975)

22. Mc Cann, J. and Ames, B.N.: The Salmonella/microsome mutagenicity test: predictive value for animal carcinogenicity.
Origins of Human Cancer, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 1431 (1977)

23. Meselson, M. and Russell, K.: Comparison of carcinogenic and mutagenic potency.
Origins of Human Cancer, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 1473 (1977)

L e b e n s l a u f

1950: 18. September geboren als Tochter des Bruno Stefani und der Anneliese Stefani geb. Albert in Kronstadt, Rumänien.

1957: Eintritt in die deutsche Volksschule in Kronstadt.

1961: Wechsel in das rumänische Gymnasium in Kronstadt.

1969: Abitur.

1971: Beginn des Medizinstudiums in Klausenburg, Rumänien.

1972: Juni, Auswanderung in die Bundesrepublik Deutschland.
Oktober, Sonderprüfung zur Anerkennung des Reifezeugnisses in Laasphe, Nordrheinwestfalen.
Ab November Tätigkeit als Schwesternhelferin im Krankenhaus Dahn/Pfalz.

1973: April, Beginn des Medizinstudiums an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

1980: Abschluß des Studiums mit dem Staatsexamen.

Anneliese Stefani

Würzburg, den 26. Juni 1980

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80